CORSO INTEGRATO DI GENETICA
AA 2011/12

Prof Alberto Turco

Giovedi 27.10.11
Lezioni 21 e 22

# DIAGNOSI PRENATALE
# DIAGNOSI PREIMPIANTO

Definizione

# Diagnosi prenatale

Con il termine diagnosi prenatale viene inteso l'insieme di indagini strumentali e di laboratorio, finalizzate a individuare definite patologie, siano esse su base genetica, infettiva, iatrogena o ambientale. I metodi per effettuare la diagnosi prenatale includono l'ecografia fetale e le indagini citogenetiche, biochimiche e molecolari effettuate su materiale fetale, ottenuto mediante prelievo di villi coriali, amniocentesi, cordocentesi o altri tessuti (cute, fegato).

# DPN – Peculiarità

- Non è richiesta dall'interessato
- Non correlazione G/F in tempo reale
- Tempi molto brevi
- Dg basata su unico test
- Invasività (circa 1% aborto)

NB : Consenso informato
Scelta autonoma

Diagnosi prenatale (DP): peculiarità……………….

…Spesso difficile se non impossibile prevedere
le conseguenze relative al fenotipo clinico…..

Si tratta forse del limite più grande della DP,
e cioè di una diagnosi fatta in virtuale assenza del
paziente….

Il feto è visibile solo indirettamente
(ecograficamente), e non è possibile
visitarlo né valutarne il grado di intelligenza..

# DIAGNOSI PRENATALE (OSTETRICA)

## NON INVASIVA

- Ecografia
- Screening biochimico su sangue materno
- (Ricerca cellule fetali su sangue materno)

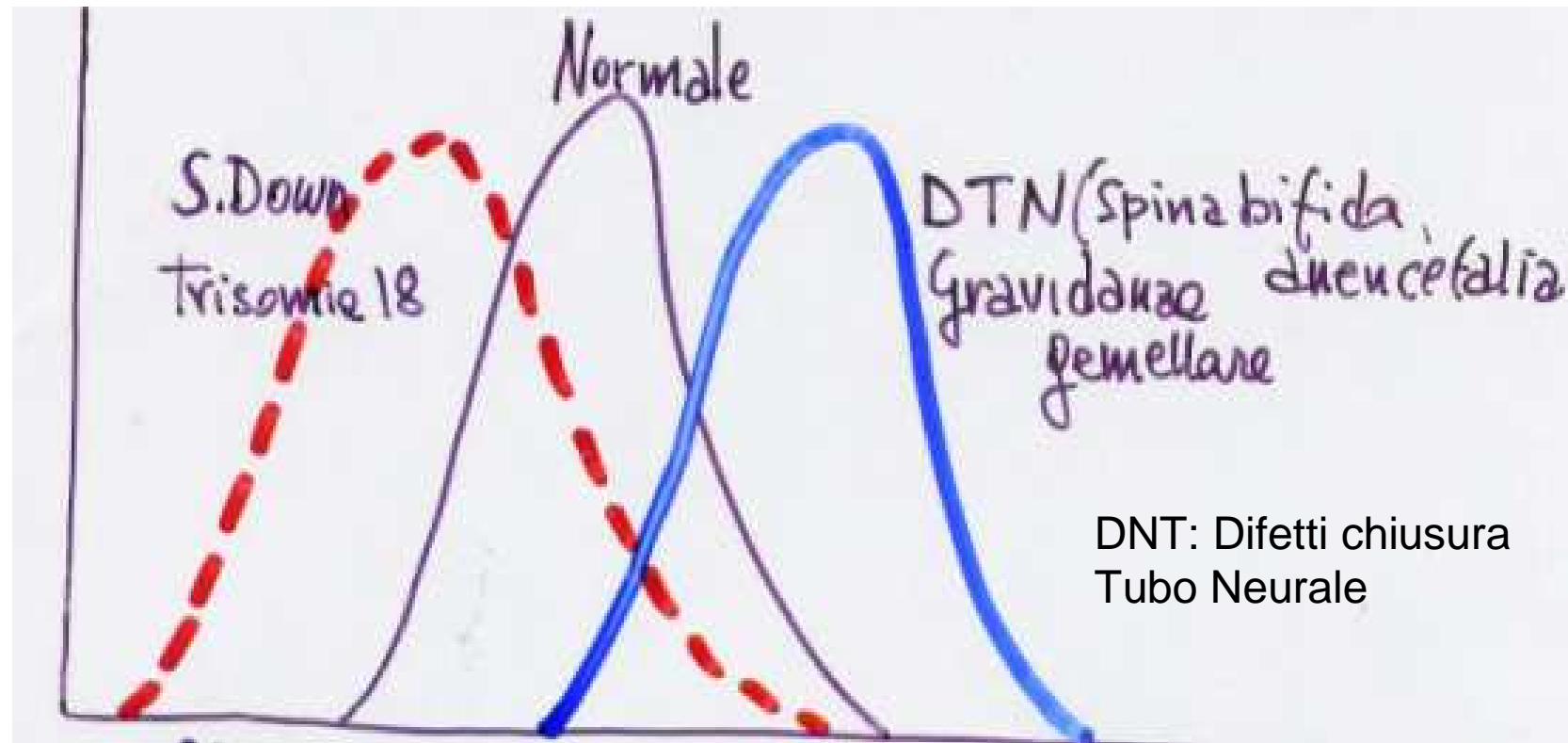
## INVASIVA

- Villocentesi
- Amniocentesi
- Funicolcentesi(cordocentesi)
- Fetoscopia

DIAGNOSI PRE-IMPIANTO (PGD)

# DP non invasiva: ecografia

**…Ultrasound is our baby……….**

# SCREENING BIOCHIMICI IN GRAVIDANZA

AFP (Alfafetoproteina) serica materna

Livelli ridotti con trisomie

# NT: Nuchal Translucency (translucenza nucale)

Fetal nuchal translucency nel 1° trimestre di gravidanza

(11a-14a settimana) Un spessore della "translucenza" maggiore o uguale a 3 mm può essere indice di cromosomopatie

(per la trisomia 21 la sensibilità è dell'80%)

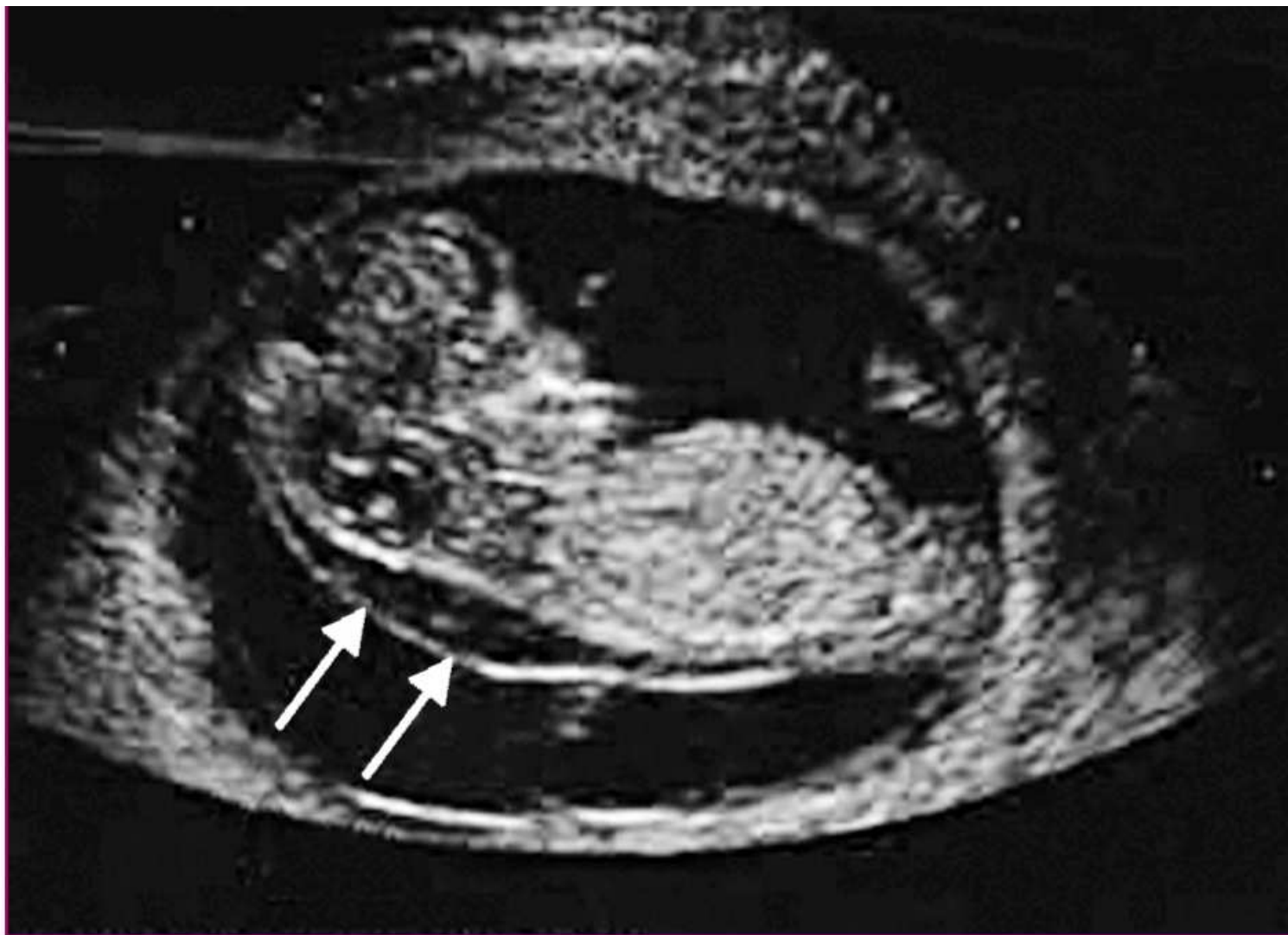



**Figura 29.1** Aumento della translucenza nucale (frecce) in un feto con sindrome di Down. Cortesia del prof. G. Noia.

Neri G, Genuardi M. Genetica umana e medica. Elsevier Masson, Milano, 2007

**Gentile Signora**

Le comunichiamo i risultati del Test Combinato a cui si è sottoposta.

Come Le è stato chiarito, l'indagine NON CONSENTE di emettere diagnosi di certezza, possibile soltanto per mezzo di ulteriori e più approfonditi esami (prelievo di villi coriali e/o amniocentesi).

Pertanto La invitiamo a rivolgersi ad un medico specialista che La possa assistere nell'interpretazione dei dati che le abbiamo fornito.

## TEST COMBINATO

**RISCHIO STIMATO PER TRISOMIA 21 DOPO TRANSLUCENZA NUCALE E DUO TEST**

| | |
|---|---|
| DATA DI NASCITA: **26/07/69** | ETA' MATERNA: **33** |
| RISCHIO PER TRISOMIA 21 IN RELAZIONE ALL'ETA' MATERNA: | 1: 362 |
| RIVALUTAZIONE DEL RISCHIO DOPO "TEST COMBINATO": | 1: 3.610 |

***Ci preme ricordare che:***

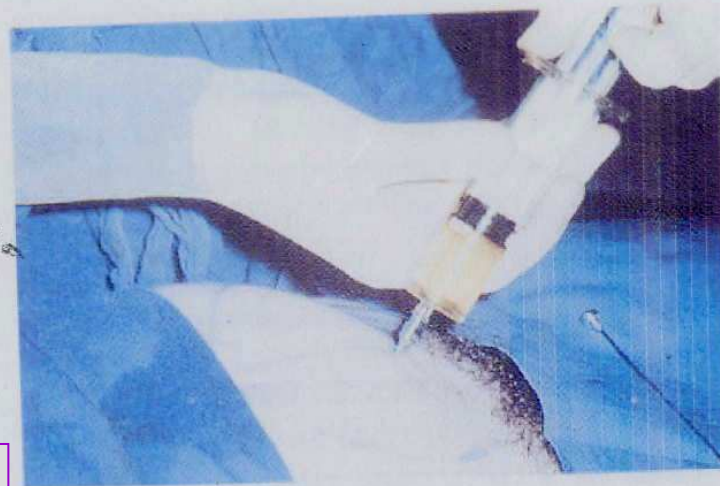
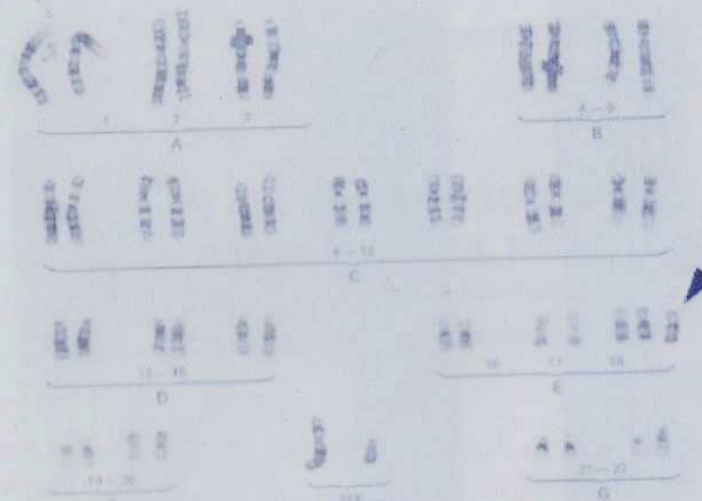
1. La rivalutazione della probabilità di anomalie cromosomiche dopo "Test Combinato" viene calcolata correlando al rischio di base legato all'età materna il rischio ricavato con la translucenza nucale e con la valutazione sul siero materno di due proteine, la PAPP-A e la BETA-HCG libera.
2. La sensibilità del "Test Combinato" secondo la Fetal Medicine Foundation di Londra, centro a cui facciamo riferimento, è intorno al 90%.
3. La risposta dell'esame è un numero che esprime una probabilità. La probabilità che il bambino sia affetto da anomalie cromosomiche è elevata se il numero è compreso tra 1/1 e 1/300. La probabilità è bassa, ma non esclude anomalie cromosomiche, se il numero è maggiore di 300.

Test combinato: "combina" diversi parametri: età, ecografia e analisi biochimica su sangue

**Figura 29.3** Rappresentazione schematica dell'intera procedura di diagnosi prenatale, che include il prelievo di materiale fetale, la coltura delle cellule fetali e le successive analisi citogenetiche o molecolari.

Neri G. Genuardi M. Genetica umana e medica. Elsevier Masson. Milano. 2007

# Diagnosi Prenatale Invasiva

## AMNIOCENTESI

Amniocentesis procedure.

Trisomy 18 karyotype detected by analysis of cultured amniotic cells

# AMNIOCENTESI

- 15/17 s.g. settimane di gestazione

- immunoprofilassi anti Rh (D) per donne Rh –

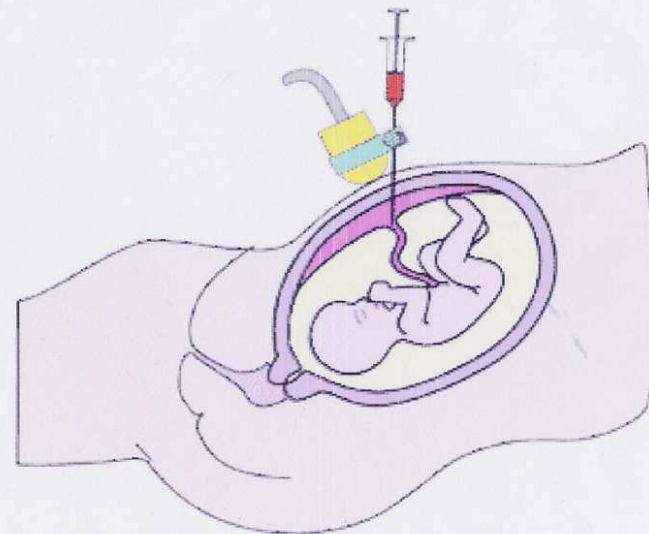
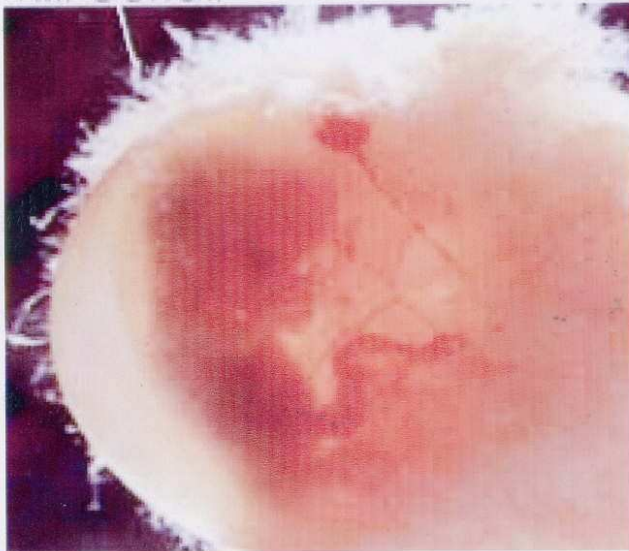
- 10/20 ml: urina + cellule fetali

- rischio di aborto: **< 1% (0.5-0.8%)**

- necessaria coltura cellulare (2-3 settimane)

- non rischio di "mosaicismo placentare" come CVS

- NB IVG = travaglio abortivo

# VILLOCENTESI

# VILLOCENTESI

(CVS = Chorionic Villus Sampling)

- dopo 11a s.g. (no <9-10sg)

- immunoprofilassi antiD per femmine Rh –

- 1-2% mosaicismo (CPM=Confined Placental Mosaicism)

- precocità e rapidità diagnosi: analisi su DNA e citogenetica (mitosi spontanee)

- evitare contaminazione materna

- rischio di aborto: circa 1%

– NB IVG = "semplice" raschiamento

Difetto in riduzione del terzo, quarto e quinto dito della mano sinistra in un neonato la cui madre aveva eseguito una villocentesi alla 10° settimana di gestazione

Neri G, Genuardi M. Genetica umana e medica. Elsevier Masson, Milano 2007

# Scheda anamnestica personale

CONSULENZA GENETICA PRENATALE – SCHEDA ANAMNESTICA PERSONALE

Sig.ra________________________________nata a____________________( ) il________

Sig________________________________ nato a____________________( ) il________

Motivo della richiesta di diagnosi prenatale invasiva:

- ☐ Età materna avanzata (EMA)
- ☐ Test biochimici di screening positivi*
- ☐ Familiarità per malattie monogeniche e/o ritardo mentale*
- ☐ Genitore portatore di riarrangiamento strutturale bilanciato*
- ☐ Precedente gravidanza con anomalia cromosomica*
- ☐ Malformazioni fetali rilevate all'ecografia*
- ☐ Altro*

* Specificare:____________________________________________________

______________________________________________________________

| Albero genealogico |
|---|
| |

Anamnesi personale e familiare__________________________________________

______________________________________________________________

______________________________________________________________

______________________________________________________________

Farmaci, Radiazioni, Esposizione a mutageni, Infezioni in gravidanza ________________________

# Atto di Consenso ad essere sottoposta a prelievo ostetrico per Diagnosi Prenatale Invasiva (o)

Io sottoscritta ..................................................................................................................
autorizzo i/il Dr. .................................................................................... a sottopormi al seguente esame:

| PROCEDURA | ☐ Prelievo Transaddominale di Villi Coriali | ☐ Amniocentesi | ☐ Cordocentesi |
|---|---|---|---|
| **Epoca del Prelievo** | Dopo la 10ª settimana | Dopo la 15ª settimana | Dopo la 18ª settimana |
| **Tecnica** | Prelievo di villi coriali dalla placenta, sotto guida ecografica continua, con un sottile ago attraversante la parete addominale materna | Prelievo di liquido dal sacco amniotico, sotto guida ecografica continua, con un sottile ago attraversante la parete addominale materna | Prelievo di sangue fetale dal cordone ombelicale, sotto guida ecografica continua, con un sottile ago attraversante la parete addominale materna |
| **Rischi Materni** | Quelli di ogni piccolo intervento chirurgico | Quelli di ogni piccolo intervento chirurgico | Quelli di ogni piccolo intervento chirurgico |
| **Rischi Fetali** | **Rischio di aborto legato alla procedura** = 1% circa<br>Rischio di malformazioni fetali: dalla 10ª settimana uguale a quello della popolazione generale | **Rischio di aborto legato alla procedura** = 1% circa<br>Rischio di malformazioni fetali: dalla 15ª settimana uguale a quello della popolazione generale | **Rischio di aborto legato alla procedura** = 2% circa |
| **Successo del Prelievo** | Nel 98% circa dei casi al primo tentativo e 99,8% circa al secondo | Nel 98% circa dei casi al primo tentativo e 99,8% circa al secondo | Nel 97% circa dei casi al primo tentativo nell'inserzione placentare della vena ombelicale |
| **Accuratezza Diagnostica** | Cariotipo<br>Fallimento dell'analisi nello 0,5%- 1%.<br>Falsi Positivi<br>(Falsi Malati) nell'1% circa dei casi (per mosaicismo).<br>Falsi Negativi<br>(Falsi Normali) con analisi diretta 1:3000, con analisi diretta + cultura 1:20000<br>DNA<br>Rischio di Falsi Negativi (Falsi Normali) con l'analisi del DNA molto rari | Cariotipo<br>Fallimento dell'analisi citogenetica nello 0,2% circa<br>Falsi Positivi<br>(Falsi Malati) nell'0,2- 0,5%. Nel caso di mosaicismo può essere opportuno procedere a cordocentesi.<br>Falsi Negativi<br>(Falsi Normali) 1: 5000 | Cariotipo<br>Gli errori diagnostici sono rari |

Essendo stata dettagliatamente informata ed essendomi stati chiariti tutti i dubbi riguardo alla procedura ed ai suoi rischi associati, e sapendo di potere chiedere all'operatore di sospendere il prelievo o che l'operatore stesso può a sua volta decidere di sospendere il prelievo in funzione di condizioni di rischio che possono evidenziarsi, ed essendo a conoscenza che l'impegno degli Ostetrici resta esclusivamente limitato al prelievo e non prende in considerazione eventuali problemi di pertinenza del Laboratorio di Genetica che esegue la diagnosi, io faccio richiesta ed acconsento a sottopormi al prelievo.

**Firma di Assenso Sig.ra** ......................................................
**Firma (Facoltativa) Sig.** ..........................................................

**Lì,** ................................

(°) **Modello proposto dalla SIEOG**

AZIENDA OSPEDALIERA
ISTITUTI OSPITALIERI DI VERONA

DIVISIONE DI OSTETRICIA E GINECOLOGIA
*Ospedale Civile Maggiore*

AMBULATORIO DIVISIONALE 023

N. PROGRESSIVO

| Cognome e nome del paziente | Data Nascita | N. Tessera Sanitaria | Sesso: [ ] F |
|---|---|---|---|
| Indirizzo: | Comune di Residenza | ULSS N. | PROV: |

| ESENZIONE | |
|---|---|
| A | NUMERO |
| R | |

**PRESCRIZIONE PROPOSTA**

DIAGNOSI PRENATALE
CONSULTO GENETICO
010301

DATA ......................

TIMBRO E FIRMA DEL MEDICO

# DP – Scheda anagrafica

**Diagnosi Prenatale Invasiva** (prelievo dei Villi Coriali/Liquido Amniotico)

| *Cognome* | *Nome* | *Data di nascita* | *Telefono* |
|---|---|---|---|
| | | / / | / |
| *Indirizzo :* | | | |
| *Tess. Sanitaria: n°* | *A.S.L. n°* | *Medico inviante: Dott.* | |

Motivo della diagnosi: ______________________________

Data ultima mestruazione :______________ Gruppo sanguigno: ________________

Epoca amenorrea: ____ (settimane) Epoca gestazionale ecografica: ____ (settimane)

B.P.D.: ______ (mm.) L.F.: ______ (mm.) C.A.: _____ (mm.) Placenta: __________

Toxo: _________ Rubeo: _______ C.M.V.: ________ VDRL - TPHA: _________

HbsAg: ________ H.C.V: _______ H.I.V.: _______ Test di Coombs: _________

Numero di inserzioni ago: ______ Quantità Villi Coriali prelevati: ______ (mg)

Quantità liquido amniotico prelevato: _______ (ml) Chiaro ____ Ematico ____

Immuno profilassi Anti-D: __________________

Data prelievo: ____/____/_______

Un insuccesso nel prelievo o nella diagnosi, che richiede la ripetizione della procedura, si può verificare nell'1% dei casi.

L'errore diagnostico, raro, è, sulla base dell'esperienza internazionale, inferiore all'1/1000.

In un caso su cento l'analisi citogenetica non consente una definizione clinica precisa, quando nel feto coesistono cellule normali e cellule anomale (fenomeno chiamato *mosaicismo*).

## Amniocentesi

L'amniocentesi è un prelievo di circa 20ml di liquido amniotico, nel quale sono presenti in sospensione cellule di sfaldamento placentari e degli epiteli fetali.

Il prelievo è eseguibile dalla 15ª settimana di gravidanza.

Le modalità di prelievo sono molto simili a quelle della villocentesi per via transaddominale, sotto continuo controllo ecografico.

Il rischio di abortività è inferiore all'1%.

Raramente si verificano conseguenze immediatamente successive al prelievo e consistono nell'infezione o nella perdita di liquido amniotico e in contrazioni della muscolatura uterina.

Come per la villocentesi, è consigliata profilassi immunitaria anti-D alla madre Rh negativo a rischio di immunizzazione materno-fetale.

L'esecuzione dell'analisi citogenetica da liquido amniotico richiede 20-25 giorni.

In rari casi l'insuccesso nel prelievo o nella diagnosi richiede la ripetizione della procedura.

## Risultato dell'esame

Se il feto presenta patologia cromosomica, il risultato dell'analisi viene comunicato in modo tempestivo da parte del genetista, che si mette in contatto telefonico con la gestante.

A seguito di una diagnosi patologica è possibile:

- Accettare il concepito affetto dall'anomalia
- Tentare una terapia del feto in utero (se disponibile)
- Predisporre un intervento correttivo postnatale
- Interrompere la gravidanza (Legge 194/1978)

Quando viene diagnosticata un'anomalia fetale, la coppia può accedere ad una consulenza con il genetista e il ginecologo, affinché ogni decisione sia presa consapevolmente, dopo aver ascoltato tutte le informazioni del caso.

Se la scelta della coppia porta all'interruzione della gravidanza le modalità di questa varieranno a seconda dell'epoca gestazionale.

L'esito scritto, comprensivo del sesso fetale, sarà spedito trascorsi almeno 30 giorni dal prelievo.

Qualora si desideri conoscere il sesso fetale, si prega di farlo presente prima del prelievo.

Al termine di gravidanza si prega di inviare al Servizio di Ecografia e Diagnosi Prenatale (S.E.D.P.A.) la "scheda di controllo dell'esito della gravidanza" debitamente compilata, in busta chiusa, a mezzo posta.

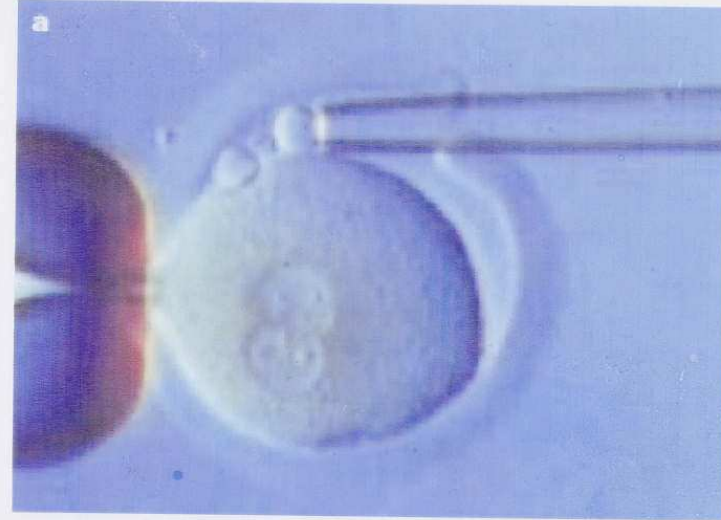
Ricordiamo che la compilazione del modulo sarà di aiuto sia per le altre gestanti, sia per una sua eventuale successiva gravidanza.

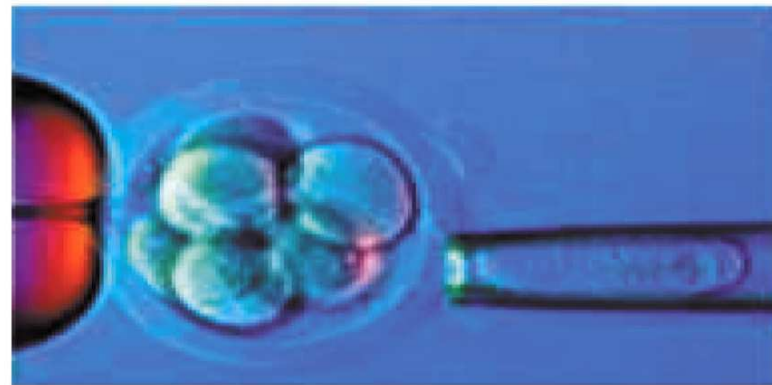
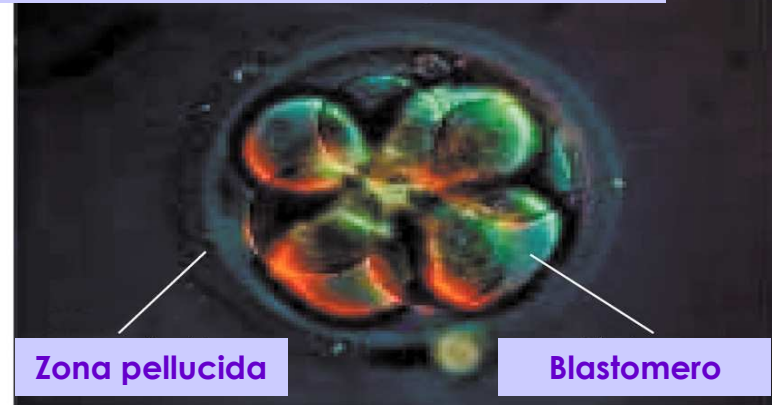
# Principali indicazioni alla diagnosi prenatale

| **Indicazione** | **Materiale da analizzare** | **Tipo di analisi** |
|---|---|---|
| Età materna ≥ 35 anni | Cellule del trofoblasto o cellule amniotiche | Esame cromosomico |
| Precedente figlio con anomalia cromosomica | Cellule del trofoblasto o cellule amniotiche | Esame cromosomico |
| Anomalia cromosomica di un genitore | Cellule del trofoblasto o cellule amniotiche | Esame cromosomico |
| Test predittivo alterato | Cellule del trofoblasto o cellule amniotiche | Esame cromosomico |
| Diagnosi ecografica di malformazione fetale | Cellule amniotiche o linfociti di sangue cordone | Esame cromosomico |
| Malattie mendeliane | Cellule del trofoblasto o cellule amniotiche | Esame del DNA |

Neri G, Genuardi M. Genetica umana e medica. Elsevier Masson, Milano 2007

# DIAGNOSI GENETICA PREIMPIANTO

# P.G.D.

# BIOPSIA DI UN BLASTOMERO DA UN EMBRIONE DI 8 CELLULE

Neri G, Genuardi M. Genetica umana e medica. Elsevier Masson, Milano 2007

# P.G.D.

# Diagnosi Genetica Preimpianto

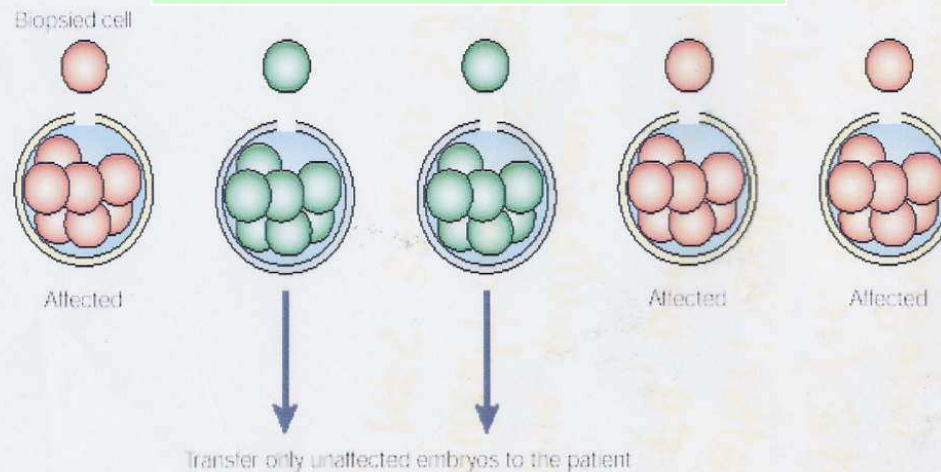



Figure 1 | **Principle of preimplantation genetic diagnosis.** A single cell (or cells) is removed from each embryo of an *in vitro*-developing cohort, on which a diagnostic genetic test is carried out. Up to three of the embryos that are unaffected are transferred to the patient in the hope of establishing a pregnancy

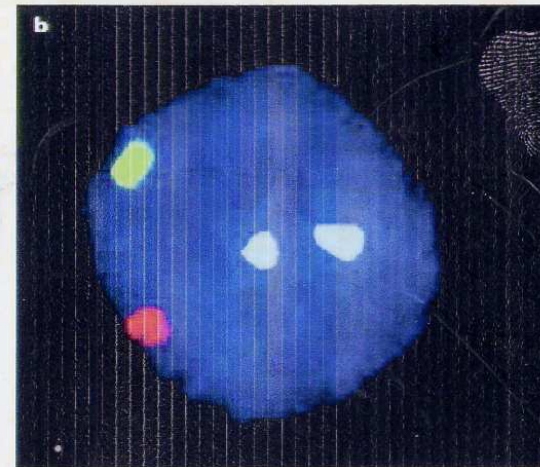
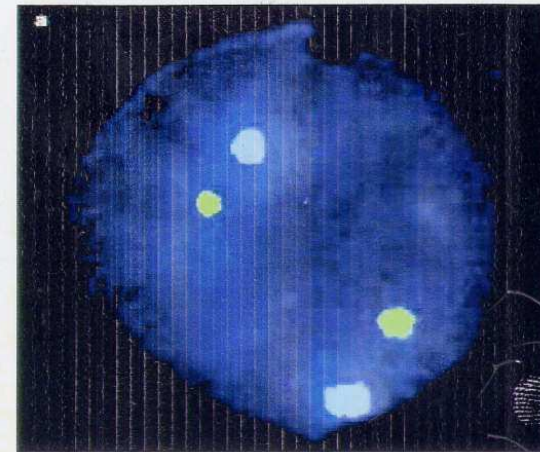
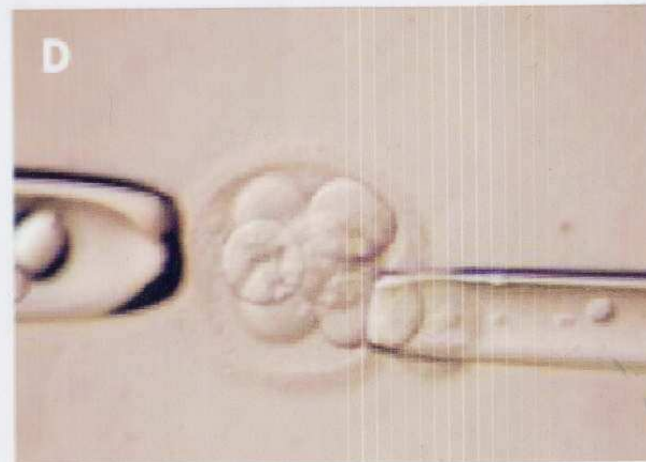
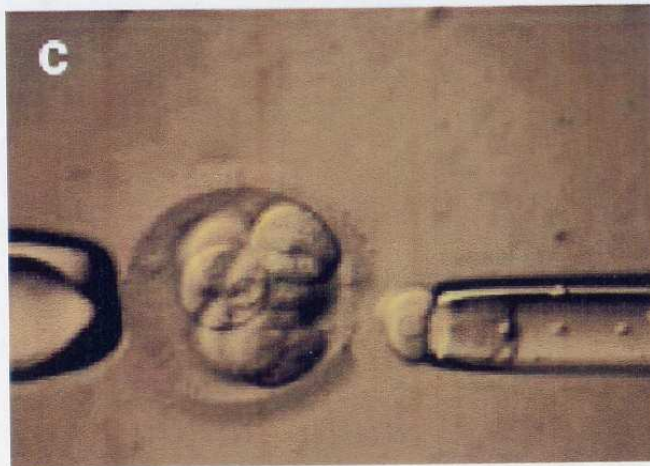
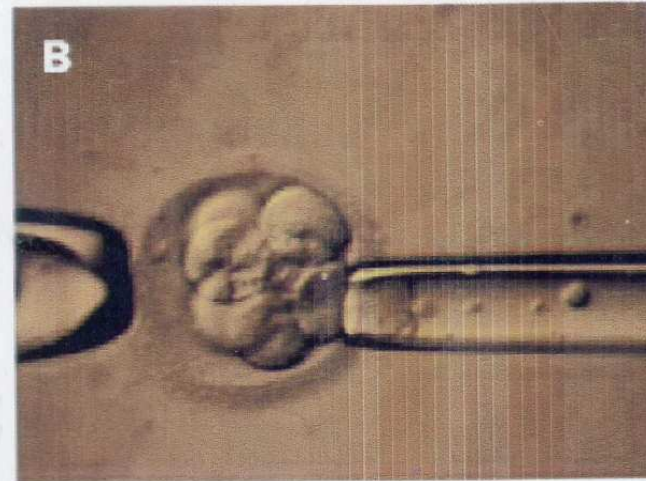
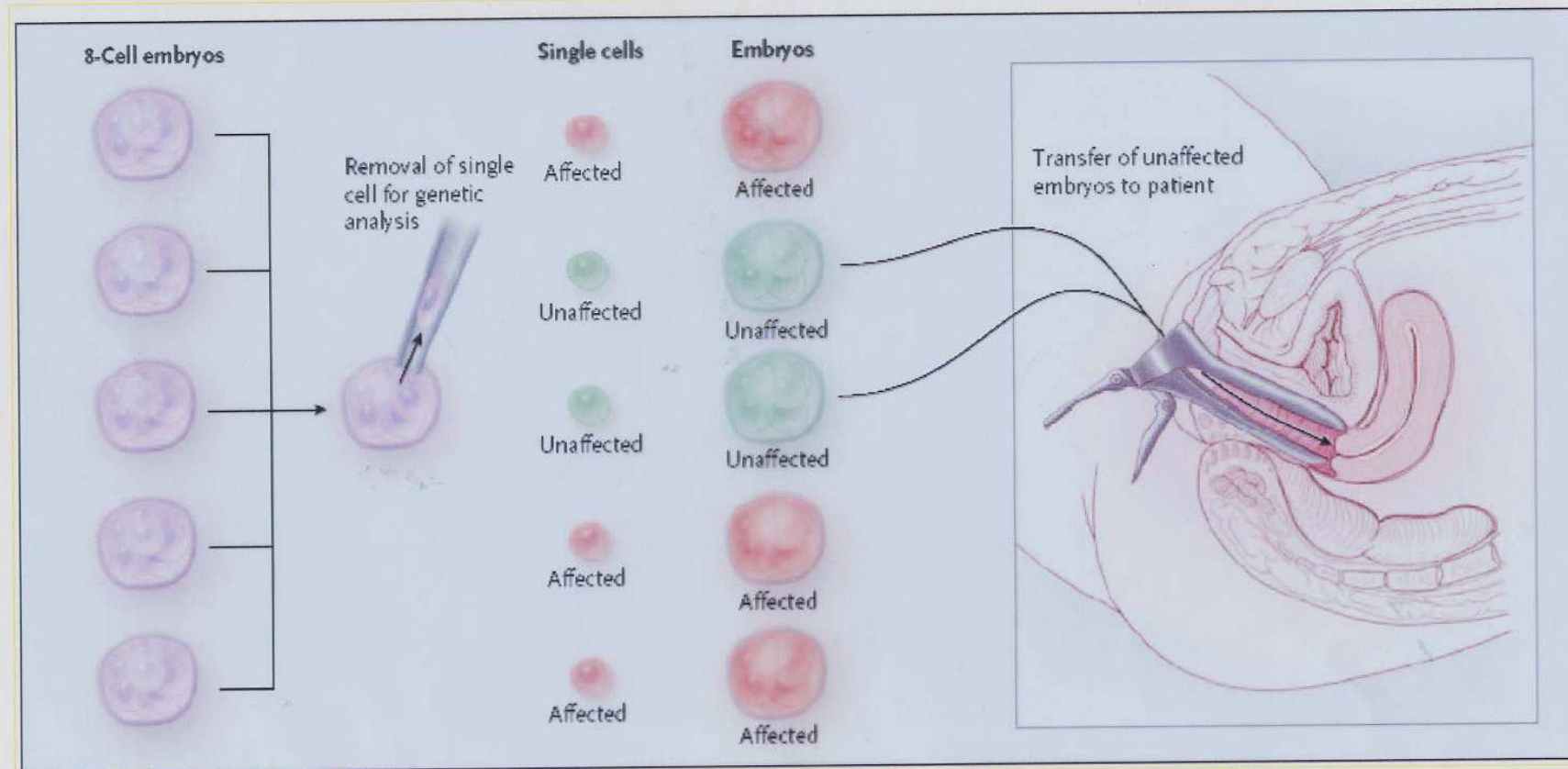
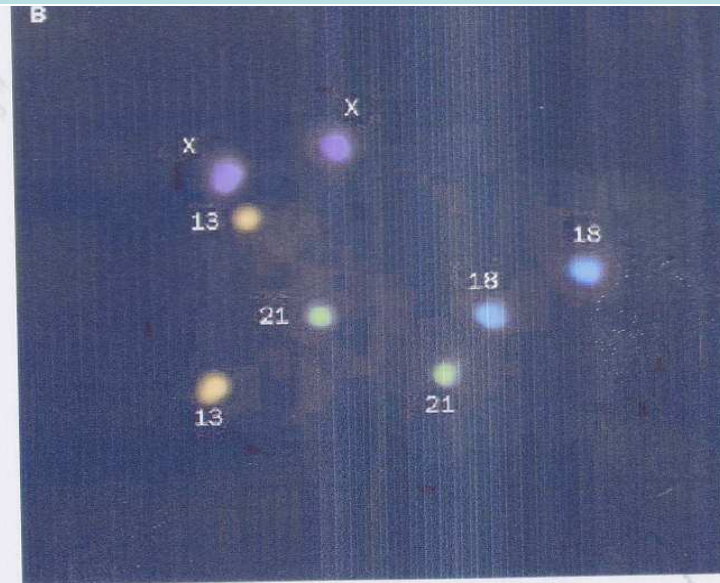
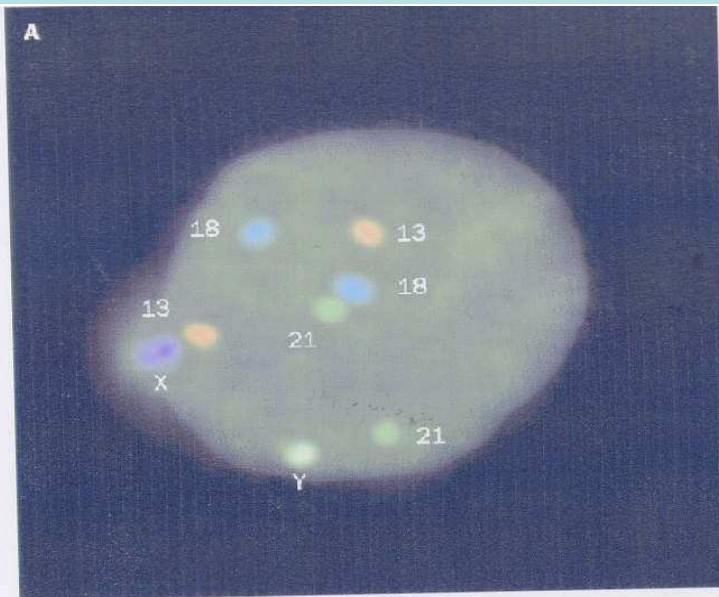



Figure 4 | **PGD of X-linked disorders using FISH.** Two nuclei that have been hybridized with probes that are complementary to sequences on chromosomes X (green), Y (red) and 18 (blue). **a** | A nucleus from the blastomere of a normal female embryo has two green and two blue signals, whereas **b** | a nucleus from a normal male has one red, one green and two blue signals.

**CLEAVAGE-STAGE BIOPSY**

A: hole in zona pellucida made with laser. B: removal of first blastomere from embryo. C: deposition of blastomere in medium. D: removal of second blastomere.

# P.G.D = Preimplantation Genetic Diagnosis

# Preimplantation Genetic Diagnosis (P.G.D)

## single-cell multicolor F.I.S.H. (Fluorescent In Situ Hybridization)

Result of five-colour FISH applied to nuclei of single blastomere

# PRINCIPALI LIMITI DELLA PGD

- Complessità dell'intero iter diagnostico
- Rischi della tecnica analitica
- Rischio gravidanze multiple
- Costi elevati

# ARGOMENTI A FAVORE DELLA PGD

PREVENZIONE DI ANOMALIE GENETICHE GRAVI PRIMA DELL'IMPIANTO E DELLA NASCITA DI BAMBINI MALATI

EVITARE L'ABORTO IN COPPIE A RISCHIO

SOTTOPOSTE A FIVET PER STERILITA' DI COPPIA

EVITARE L'ABORTO IN COPPIE A RISCHIO CON RIPETUTE ESPERIENZE DI DIAGNOSI PRENATALE SEGUITE DA INTERRUZIONI SELETTIVE

# PGD e Anemia falciforme (JAMA, 281:1701,1999)

## First Unaffected Pregnancy Using Preimplantation Genetic Diagnosis for Sickle Cell Anemia

Kangpu Xu, PhD
Zhong Ming Shi, MD
Lucinda L. Veeck, MLT, DSc
Mark R. Hughes, MD, PhD
Zev Rosenwaks, MD

**Context** Sickle cell anemia is a common autosomal recessive disorder. However, preimplantation genetic diagnosis (PGD) for this severe genetic disorder previously has not been successful.

**Objective** To achieve pregnancy with an unaffected embryo using in vitro fertilization (IVF) and PGD.

**Design** Laboratory analysis of DNA from single cells obtained by biopsy from embryos in 2 IVF attempts, 1 in 1996 and 1 in 1997, to determine the genetic status of each embryo before intrauterine transfer.

**Setting** University hospital in a large metropolitan area.

**Patients** A couple, both carriers of the recessive mutation for sickle cell disease.

**Interventions** Standard IVF treatment, intracytoplasmic sperm injection, embryo biopsy, single-cell polymerase chain reaction and DNA analyses, embryo transfer to uterus, pregnancy confirmation, and prenatal diagnosis by amniocentesis at 16.5 weeks' gestation.

**Main Outcome Measure** DNA analysis of single blastomeres indicating whether embryos carried the sickle cell mutation, allowing only unaffected or carrier embryos to be transferred.

**Results** The first IVF attempt failed to produce a pregnancy. Of the 7 embryos analyzed in the second attempt, PGD indicated that 4 were normal and 2 were carriers; diagnosis was not possible in 1. Three embryos were transferred to the uterus on the fourth day after oocyte retrieval. A twin pregnancy was confirmed by ultrasonography, and subsequent amniocentesis revealed that both fetuses were unaffected and were not carriers of the sickle cell mutation. The patient delivered healthy twins at 39 weeks' gestation.

**Conclusion** This first unaffected pregnancy resulting from PGD for sickle cell anemia demonstrates that the technique can be a powerful diagnostic tool for carrier couples who desire a healthy child but wish to avoid the difficult decision of whether to abort an affected fetus.

*JAMA. 1999;281:1701-1706*

www.jama.com

Sickle cell anemia is one of the most common human autosomal recessive disorders. It is caused by a mutation substituting thymine for adenine in the sixth codon (GAG to GTG) of the gene for the β-globin chain on chromosome 11p, thereby encoding valine instead of glutamic acid in the sixth position of the globin chain. The frequency of sickle cell trait (carrier status) among the African American population at birth is about 8%, and the incidence of sickle cell anemia at birth is 0.16%, or 1 per 625 births.[1] Furthermore, the widespread presence of the sickle gene in other ethnic groups has also been confirmed.[2] For example, in urban centers in the United States, nearly 10% of patients with various sickling disorders identify themselves as non–African American.[3]

Children affected with sickle cell anemia experience recurrent episodes of pain (during sickle cell crises) and increased susceptibility to potentially life-threatening conditions, including bacterial infections, cerebrovascular accidents, and organ failure. According to US statistics collected between 1981 and 1992, there were 6.8 deaths per 1000 African American children aged 1 to 4 years due to sickle cell disease.[4] Life expectancy for persons with sickle cell disease varies and there is an age-related pattern in mortality rates: a peak in patients younger than 5 years, with a gradual increase starting in late adolescence.[5] Progress in the treatment of sickle cell disease has been slow.[6] At present,

**See also Patient Page.**

**Author Affiliations:** The Center for Reproductive Medicine and Infertility and the Department of Obstetrics and Gynecology, Weill Medical College of Cornell University, New York, NY (Drs Xu, Shi, Veeck, and Rosenwaks); and the Department of Reproductive Genetics, Wayne State University, Detroit Medical Center, Detroit, Mich (Dr Hughes).
**Corresponding Author and Reprints:** Zev Rosenwaks, MD, The Center for Reproductive Medicine and Infertility, Weill Medical College of Cornell University, 505 E 70th St, Room HT326a, New York, NY 10021 (e-mail: zrosenw@mail.med.cornell.edu).

15-APR-2005

CORRIERE DELLA SERA

Quotidiano Milano Direttore: Paolo Mieli Lettori Andipress 2927000

L'intervento in un centro estero. I genitori: rabbia quando sentiamo parlare di tecniche salvavita vietate dalla legge sulla fecondazione

# Neonato «su misura» per curare la sorellina

*Per la prima volta una coppia italiana seleziona gli embrioni. «Così batteremo la talassemia»*

ROMA — «Per salvare Marta sarei pronto a qualsiasi cosa. Anche alla clonazione. L'amore per una figlia gravemente malata è più forte di ogni cosa». L'ostacolo più impervio Antonio G. l'ha saltato assieme alla moglie, Maria D. Come ultima risorsa hanno deciso di avere un *designer baby*. Un bebè concepito su misura, con tecniche di fecondazione assistita, perché una volta nato diventasse donatore di cellule staminali per la sorellina maggiore, talassemica. La speranza di cura è riposta nel ventre di questa donna leccese, al secondo mese di gravidanza.

Se tutto andrà bene, il cordone ombelicale del neonato servirà per trarne cellule da trapiantare. E' il primo *designer baby* italiano, selezionato con la diagnosi pre-impianto. Tra gli embrioni ottenuti in provetta sono stati scelti quelli privi della talassemia, poi sottoposti ad un'ulteriore cernita. L'utero materno ha accolto solo quelli che presentavano compatibilità con Marta. In Italia è vietato dalla legge sulla fecondazione assistita, che fra meno di due mesi sosterrà l'esame popolare del referendum. L'abolizione del divieto di diagnosi embrionale è uno dei 4 quesiti. La coppia leccese si è affidata a un centro straniero, il *Memorial Hospital* di Istanbul, lo stesso dove pochi mesi fa è stato selezionato un bambino turco. Il fratello maggiore, leucemico, ha ricevuto le sue staminali, il trapianto a Pavia, dal professor Locatelli.

Francesco Fiorentino

È la conclusione di una lunga e dolorosa storia che Antonio racconta prima senza tradire emozioni. Poi però si lascia andare: «Solo ora io e mia moglie ci sentiamo tranquilli. Sappiamo di aver tentato tutto il possibile. La clonazione? Non ci penserei due volte, è solo un problema di soldi, che non possiedo. Ho speso tutto quello che avevo, mi sono indebitato, ho lasciato per due mesi il lavoro e per fortuna ho ricevuto la comprensione del capo dell'azienda e l'aiuto economico del centro di Istanbul. Provo un profondo senso di rabbia quando sento condannare le tecniche che potrebbero dare una cura a tante creature afflitte da malattie genetiche. Selezionare embrioni non significa puntare alla razza ariana, cercare bambini con occhi azzurri e capelli biondi, vuol dire dare un futuro ad una ragazzina amata visceralmente».

Marta è nata nel '92. Sembrava perfettamente sana, i genitori hanno scoperto che aveva il morbo di Cooley solo durante la seconda gravidanza. Mostrando le analisi ai medici hanno compreso quale tipo di eredità rischiavano di trasmettere ai figli. Marta è risultata talassemica, ma fortunatamente il fratellino, Luca, è venuto al mondo sano, possibilità che riguarda un caso su 4. «Non ci siamo arresi — continua Antonio —. La bambina è stata messa in lista per una donazione di midollo. Non se ne trovavano. Abbiamo deciso di fare un terzo figlio, senza provetta. Il gioco del lotto. Flavia, la terzogenita, è nata sana, ma senza le caratteristiche di compatibilità necessarie per curare la sorella». Antonio non demorde. Passa la notte al computer, si documenta, con la moglie attraversa l'Italia richiamato in centri del Nord dalla prospettiva di soluzioni che poi si rivelano non percorribili.

Marzo 2004, la legge sulla procreazione assistita gli sbarra la strada. Un giorno scopre l'esistenza del *Memorial Hospital* di Istanbul, dove il biologo molecolare Francesco Fiorentino ha creato lo stesso centro esistente a Roma, dove però molte tecniche non sono consentite. Rinasce la speranza. A Marta è stato spiegato che quel quarto bambino vedrà la luce per lei. «Gli vorrò un bene grande da qui all'infinito», sorride fiduciosa.

**Margherita De Bac**

Molecular Human Reproduction Vol.10, No.6 pp. 445–460, 2004
Advance Access publication March 25, 2004

DOI: 10.1093/molehr/gah055

# Development and clinical application of a strategy for preimplantation genetic diagnosis of single gene disorders combined with HLA matching

F.Fiorentino[1,3,4], A.Biricik[1], H.Karadayi[2], H.Berkil[2], G.Karlikaya[2], S.Sertyel[2], D.Podini[3], M.Baldi[1], M.C.Magli[1], L.Gianaroli[1] and S.Kahraman[2]

[1]EmbryoGen (Centre for Preimplantation Genetic Diagnosis), Rome, [2]Reproductive Endocrinology and Genetics Unit, Istanbul Memorial Hospital, Istanbul, Turkey and [3]GENOMA (Molecular Genetics Laboratory), Rome, Italy

[4]To whom correspondence should be addressed at: EmbryoGen (Preimplantation Genetic Diagnosis Centre), Via Po, 102 00198 Rome. Italy. E-mail: fiorentino@embryogen.it

**Preimplantation HLA matching has recently emerged as a tool for couples desiring to conceive a potential donor progeny for transplantation in a sibling with a life-threatening disorder. In this paper we describe a strategy optimized for preimplantation genetic diagnosis (PGD) of haemoglobinopathies combined with HLA matching. This procedure involves a minisequencing-based genotyping of HLA regions A, B, C and DRB combined with mutation analysis of the gene regions involved by mutation. Analysis of at least eight polymorphic short tandem repeat (STR) markers scattered through the HLA complex has also been included to detect potential contamination and crossing-over occurrences between HLA genes. The above assay can also be used for preimplantation HLA matching as a primary indication. The strategy was clinically applied for HLA matching in 17 cycles (14 for β-thalassaemia, one for Wiscott–Aldrich syndrome and two for leukaemia). A reliable HLA genotype was achieved in 255/266 (95.9%) of the blastomeres. In total, 22 (14.8%) embryos were obtained that were HLA-matched with the affected siblings, 14 (9.4%) of which were unaffected and transferred back to the patients. Four clinical pregnancies were obtained, three of which (one twin, two singletons) are ongoing and were confirmed as healthy and HLA-identical with the affected children. Minisequencing-based HLA typing combined with HLA STR haplotyping has been shown to be a reliable strategy for preimplantation HLA matching. The major advantage of this approach is that the validation of a single assay can be done once and then used for the majority of the patients, reducing notably time needed for preclinical set-up of each case.**

*Key words*: haematopoietic stem cell transplantation/microsatellites/minisequencing/preimplantation HLA matching/preimplantation genetic diagnosis

## Introduction

Preimplantation genetic diagnosis (PGD) of single gene disorders,

transfer) seems to be acceptable on ethical grounds (Pennings *et al.*, 2002; Robertson, 2003).

JAMA 291:2079, May 5 2004

# Preimplantation HLA Testing

Yury Verlinsky, PhD
Svetlana Rechitsky, PhD
Tatyana Sharapova, MS
Randy Morris, MD
Mohammed Taranissi, MD
Anver Kuliev, MD, PhD

**Context** Preimplantation genetic diagnosis (PGD) has become an option for couples for whom termination of an affected pregnancy identified by traditional prenatal diagnosis is unacceptable and is applicable to indications beyond those of prenatal diagnosis, such as HLA matching to affected siblings to provide stem cell transplantation.

**Objective** To describe preimplantation HLA typing, not involving identification of a causative gene, for couples who had children with bone marrow disorders at need for HLA-matched stem cell transplantation.

**Design, Setting, and Participants** HLA matching procedures conducted at a single site during 2002-2003 in an in vitro fertilization program for 9 couples with children affected by acute lymphoid leukemia, acute myeloid leukemia, or Diamond-Blackfan anemia requiring HLA-matched stem cell transplantation. In 13 clinical cycles, DNA in single blastomeres removed from 8-cell embryos following in vitro fertilization was analyzed for HLA genes simultaneously with analysis for short tandem repeats in the HLA region to select and transfer only those embryos that were HLA matched to affected siblings.

**Main Outcome Measures** Results of HLA matching and pregnancy outcome.

**Results** As a result of testing a total of 199 embryos, 45 (23%) HLA-matched embryos were selected, of which 28 were transferred in 12 clinical cycles, resulting in 5 singleton pregnancies and birth of 5 HLA-matched healthy children.

**Conclusion** This is the first known experience of preimplantation HLA typing performed without PGD for a causative gene, providing couples with a realistic option of having HLA-matched offspring to serve as potential donors of stem cells for their affected siblings.

*JAMA. 2004;291:2079-2085*

www.jama.com

PREIMPLANTATION GENETIC DIAGNOSIS (PGD) has become available as an alternative to prenatal diagnosis in order to avoid the risk for pregnancy termination, because PGD allows selection of unaffected embryos before a pregnancy is established. Despite the need for ovarian stimulation and in vitro fertilization (IVF) to be part of the procedure, PGD has become an acceptable method for avoiding the birth of children with genetic disorders.[1-3] Introduced more than a decade ago, PGD has been applied in thousands of clinical cycles.[4]

At present, more than 100 different genetic conditions are indications for PGD, including a few novel indications for which traditional prenatal diagnosis has never been used.[5-7] This includes preimplantation HLA matching combined with PGD, not only to allow couples to have an unaffected child, but also to select a potential donor progeny for stem cell transplantation.[8] The approach has previously been applied to avoid the birth of a child with Fanconi anemia (FA), which is a severe autosomal recessive disorder characterized by inherited bone marrow failure requiring bone marrow or cord blood transplantation from an HLA-matched sibling.[8] This approach resulted in the birth of an HLA-matched child free of FA whose cord blood stem cells were transplanted to the affected sibling with FA, resulting in a successful hematopoietic reconstitution. HLA matching would not be considered appropriate for prenatal diagnosis because of the potential for termination of pregnancy, which could not be justified for the reason of HLA incompatibility.

**For editorial comment see p 2125.**

We describe the first clinical experience of preimplantation HLA matching without PGD of a causative gene, demonstrating the feasibility of this novel approach for stem cell transplantation in siblings with bone marrow failure.

## METHODS

### Setting

The preimplantation testing procedures were conducted at the Reproductive Genetics Institute (RGI), Chicago, Ill. The RGI was established in 1989 and in 1994 was designated as a Pan American Health Organization/World Health Organization Collaborating Center for Prevention of Genetic Disorders. The study was ap-

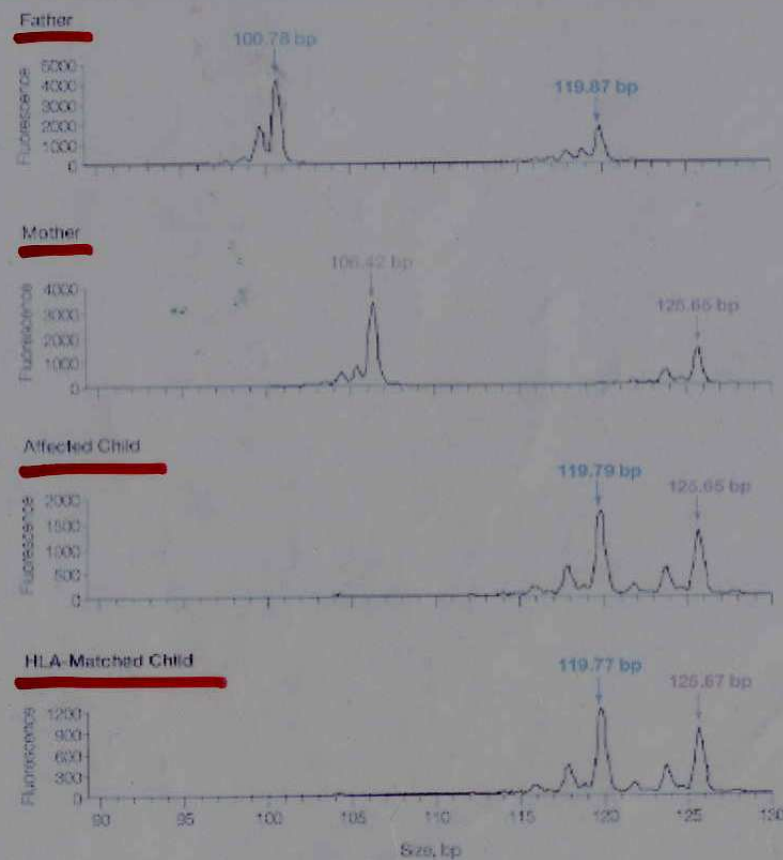
**Author Affiliations:** Reproductive Genetics Institute, Chicago, Ill (Drs Verlinsky, Rechitsky, Morris, and Kuliev and Ms Sharapova); and Assisted Reproduction and Gynaecology Center, London, England (Dr Taranissi).

**Corresponding Author:** Anver Kuliev, MD, PhD, Reproductive Genetics Institute, 2825 N Halsted St, Chicago, IL 60657 (anverkuliev@hotmail.com).

# PREIMPLANTATION HLA TESTING



**Figure 1.** Set of Polymorphic STR Markers in HLA Region of Chromosome 6 Used for Preimplantation HLA Typing

**Figure 2.** Example of Typing for Short Tandem Repeat Markers Showing a Capillary Electrophoregram of Fluorescently Labeled Polymerase Chain Reaction Products of the MIB Marker

# PGD e HLA matching

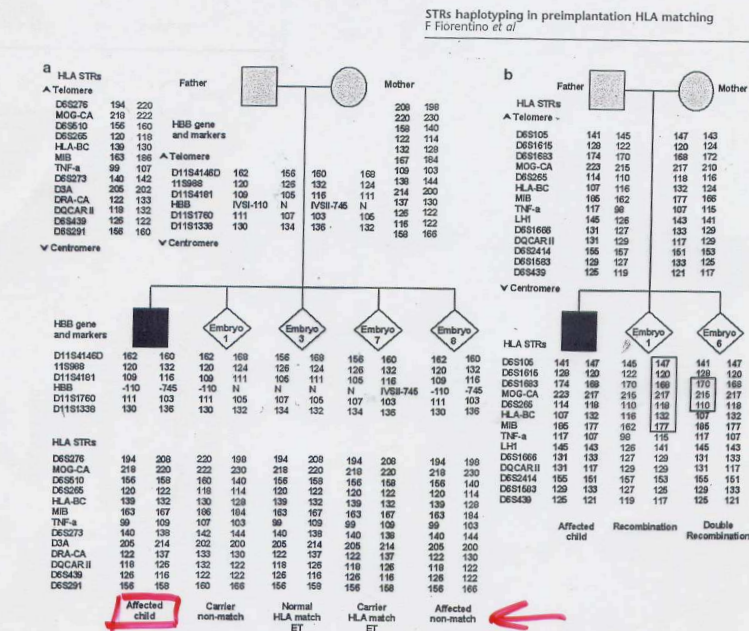



**Figure 1** (a) Preimplantation HLA matching in combination with PGD for $\beta$-thalassaemia, resulting in the birth of two twins, HLA matched with the affected sibling. Specific haplotypes were determined by genomic DNA analysis of HLA STR markers and Beta globin (HBB) gene-linked markers from father, mother (upper panel) and affected child (lower panel-left side, black square). Informative STR markers are ordered from telomere (top) to centromere (bottom). The numbers in STR markers represent the size of PCR products in base pair. Paternally and maternally derived HLA haplotypes matched to the affected child and STR alleles linked to the paternal and maternal mutations are represented in boldface. Examples of different results of HBB mutation analysis and HLA haplotyping from biopsied blastomeres are shown in the lower panel. The HLA identity of the embryos with the affected sibling has been ascertained evaluating the inheritance of the matching haplotypes. Embryos 1 (carrier) and 8 (affected) represent HLA non identical embryos. Embryo 3 was diagnosed as normal, and embryo 7 as carrier, HLA matched with the affected sibling. ET = embryo transfer. (b) Example of recombination detection in a preimplantation HLA-matching cycle for a sporadic form of Diamond–Blackfan anemia (DBA). Embryo 1 shows a single recombination occurrence in maternal haplotype, between markers D6S105 and MIB (square); in embryo 6, initially appearing to be HLA matched with the affected sibling, a double recombination event in paternal haplotype, between markers D6S1683 and D6S265 (square), is evident.

have already been transplanted to the affected siblings of three couples, resulting in a successful haematopoietic reconstruction for all the patients. These preliminary results, combined with the recently reported successful HSC transplantations,[5,11,12] are very encouraging and suggest that preimplantation HLA matching could represent an acceptable alternative for the achievement of a successful treatment in children affected by severe congenital or acquired bone marrow disorders, in the absence of a compatible related donor.

In conclusion, the reliability and robustness of the STR HLA haplotyping protocol makes this method an attractive strategy for preimplantation HLA matching. The present results confirm the feasibility of the procedure, providing a realistic option for couples to have a child, who would also serve as a UCB donor for an existing affected sibling in

## Osservatorio: temi della settimana

12/5/2004

### Usa: bambini selezionati per essere donatori

Un gruppo di medici statunitensi ha utilizzato alcuni test genetici per aiutare cinque coppie a concepire 'bambini-medicine', ovvero idonei a poter donare il loro sangue e il loro midollo osseo a fratelli e sorelle malati. Lo ha annunciato l'istituto genetico riproduttivo di Chicago. Il sangue del cordone ombelicale di uno dei neonati ha già permesso di salvare un bambino, mentre un altro piccolo malato è in attesa di un trapianto, ha fatto sapere l'istituto che ha pubblicato uno studio sul giornale dell'Associazione medica americana. "La selezione degli embrioni in funzione della loro compatibilità resta ancora una materia controversa e non è autorizzata in alcuni paesi, ma si tratta di un'opzione ragionevole per alcune coppie", ha spiegato il direttore dell'istituto, Yury Verlinsky, pioniere nel settore della diagnostica pre-impiantatoria.

**Commento di ALBERTO TURCO, professore associato di Genetica Medica del Dipartimento Materno Infantile e Biologia Genetica all'Università degli Studi di Verona - Facoltà di Medicina e Chirurgia**

*Nel 1978 è nata in Inghilterra la prima "bimba in provetta", Louise Brown. Da allora migliaia e migliaia di bambini sono venuti al mondo mediante tecniche di riproduzione assistita. La riproduzione umana non è più quindi un fatto soltanto naturale. Una tecnica recente, e ancora per molti aspetti sperimentale, è la diagnosi genetica preimpianto (Preimplantation Genetic Diagnosis, PGD), che permette, dopo fecondazione in vitro, l'analisi molecolare, genetica o cromosomica di una singola cellula (chiamata blastomero) prelevata con tecniche microchirurgiche da una morula (stadio precocissimo di sviluppo embrionale), di un embrione a rischio di gravi malattie*

# PGD: aspetti etici

- **Analisi per caratteri non legati a malattie**
  - Sesso
  - Altri tratti vantaggiosi ?
- **Analisi utile per altri membri affetti della famiglia**
  - PGD e compatibilità HLA
- **Analisi per geni di suscettibilità e per malattie dell'adulto**
  - Geni di suscettibilità a tumori
  - Geni per HD, AD ed altre malattie ad insorgenza tardiva

CdS 14.5.06

Non ereditata la malattia dalla mamma. Le proteste: «Scartate in laboratorio altre possibili vite»

# Embrione selezionato, non avrà il cancro

*Londra, diagnosi pre-impianto. Gli scienziati e i politici si dividono*

**Con la fecondazione artificiale un bimbo nascerà senza il gene che poteva causargli un tumore. Polemiche a Londra.** ■ A pag 19 **Arachi e De Carolis**

## I LACCI ITALIANI

*di* GIUSEPPE REMUZZI

*Mamma e papà in Inghilterra hanno deciso per la fertilizzazione in vitro e hanno chiesto ai me-*

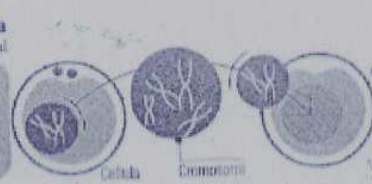
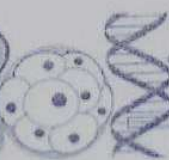
D'AGOSTINO

## «Ma questo intervento è eticamente scorretto»

ROMA — Francesco D'Agostino, lei è il presiden-

NB Retinoblastoma



**Malattie e genetica**
La diagnosi degli embrioni

La cellula

La selezione

Londra, la madre soffre di una forma ereditaria di tumore alla retina. Selezionati gli embrioni sani

# Feto geneticamente modificato quel bimbo nascerà senza cancro

**Il primo caso**

Il primo caso di screening pre-impianto avvenne **in Gran Bretagna nel 1990** su un embrione a rischio di una **malattia del cromosoma X**

**Le malattie**

Finora serviva a **diagnosticare** malattie genetiche causate dal difetto di un solo gene, ben conosciute, come nel caso della **fibrosi cistica o della còrea di Huntington**

DAL NOSTRO CORRISPONDENTE
**ENRICO FRANCESCHINI**

LONDRA — Una donna inglese che

La tecnica è stata applicata per la prima volta in un caso di rischio di tumore ereditario all'occhio. Gli scienziati si dividono

# Embrione selezionato. «Così non avrà il cancro»

*Londra, fecondazione artificiale e diagnosi pre-impianto per evitare al bimbo il male della mamma*

Il Times di ieri ha raccontato del primo bambino cancer free, cioè senza il cancro ereditato da uno dei genitori, in un caso di retinoblastoma. Sopra, la pagina del quotidiano inglese

Foto: «The Times» — CORRIERE DELLA SERA

LONDRA — Un bimbo sano, o almeno privo del gene che avrebbe potuto causargli un tumore all'occhio nel primo anno di vita. È finito sulla prima pagina del *Times* il caso di una coppia che ha utilizzato la fecondazione artificiale avvalendosi della diagnosi genetica pre-impianto ed eliminando così la possibilità di avere un figlio affetto dalla stessa malattia della madre, un retinoblastoma ereditario. Per il quotidiano britannico si tratta del primo bebè creato su misura per essere cancer-*free*, libero dal cancro all'occhio. In realtà il piccolo in questione, che dovrebbe nascere tra 4 mesi, ha solo la certezza di non sviluppare la forma cancerogena che ha segnato la

> La gioia del medico: «Abbiamo la possibilità di sradicare questa anomalia genetica per generazioni»

od Eye Cancer Trust, gruppo di supporto per famiglie con figli affetti da retinoblastoma, la notizia darà invece nuove speranze a genitori che vogliono evitare ai figli di ereditare la loro totale o parziale cecità. «Ora sappiamo che le famiglie hanno una scelta».

L'embrione cui spetta il primato è stato creato nei laboratori dell'University College Hospital di Londra da Paul Serhal, un pioniere della diagnosi pre-impianto che ha espresso la soddisfazione sua e della famiglia: «Siamo tutti al settimo cielo, stiamo parlando della possibilità di sradicare questa anomalia genetica per generazioni intere. Lo facciamo spesso, ma è stra-

sono oggi circa 200 i disturbi per i quali nel Regno Unito si può effettuare la diagnosi pre-impianto.

La mamma e il papà del primo bebè cancer-*free* non avevano problemi di fertilità, hanno utilizzato la fecondazione artificiale solo per selezionare un embrione sano. La felicità che possono provare è stata indirettamente raccontata al *Times* da un'altra mamma affetta da retinoblastoma e cieca da un occhio. Era in cura dal professor Serhal quando è rimasta incinta naturalmente. «Abbiamo fatto l'amniocentesi e le due settimane che abbiamo aspettato per i risultati sono state terribili. Grazie al cielo non abbiamo dovuto scegliere cosa fare». La bimba che porta in grembo, e che nascerà tra due mesi, è completamente sana.

**Paola De Carolis**

D'AGOSTINO

## «Ma questo intervento è eticamente scorretto»

ROMA — **Francesco D'Agostino, lei è il presidente del nostro comitato nazionale di bioetica, cosa ne pensa di questo bambino che a Londra è stato creato su misura per non ammalarsi di cancro, della stessa malattia di sua mamma?**

«Detta così potrebbe sembrare una cosa soltanto positiva».

**Ma...?**

«Ma non lo è più se invece stiamo parlando di un intervento genetico a fine selettivo. Nel nostro Paese questo non è ammesso nemmeno legalmente».

**Questo bambino rischiava di ammalarsi di un retinoblastoma ereditario, una brutta malattia...**

Francesco D'Agostino

«E lo scopo terapeutico è sicuramente lodevole. Però non stiamo parlando di un embrione che era già malato, bensì di un embrione che rischiava di ammalarsi. È stata dunque fatta una selezione a prescindere a danno di altri embrioni: selettiva, appunto. È questa pratica che non è eticamente corretta».

**Cosa è eticamente corretto allora?**

«Qualunque intervento di terapia genica che va a favore dell'embrione, ma questo soltanto dopo che l'embrione si è formato. Questo in Italia è corretto sia da un punto di vista etico sia da un punto di vista giuridico. Soltanto che da noi non abbiamo ancora mai effettuato alcun intervento di terapia genica».

**E questo intervento sull'embrione inglese?**

«Questo non è un intervento basato su una classica diagnosi prenatale a fine terapeutico: lo ripeto, questo è concesso da noi senza problemi. Qui ci troviamo di fronte a un intervento di terapia genica che mette in gioco più embrioni. Ed è tutta un'altra storia».

**Alessandra Arachi**

CdS 14.5.06

Non ereditata la malattia dalla mamma. Le proteste: «Scartate in laboratorio altre possibili vite»

# Embrione selezionato, non avrà il cancro

*Londra, diagnosi pre-impianto. Gli scienziati e i politici si dividono*

Una legge controversa……………………..

CdS 24.1.08

**La sentenza** Il Tribunale: incostituzionale il divieto di congelarli

# Il Tar boccia la legge 40 Embrioni, sì alle analisi

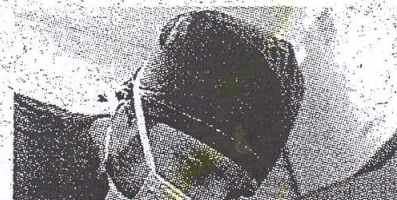
*Il comitato di bioetica: no ai limiti per rianimare i neonati*

**FECONDAZIONE ASSISTITA.** Nuova bocciatura per la legge 40

# Il Tar del Lazio dice sì alla diagnosi genetica

I giudici annullano le linee guida perché «illegittime per eccesso di potere» e anticostituzionali

«la diagnosi genetica preimpianto deve ritenersi del tutto legittima».

La III Sezione del Tribunale Amministrativo solleva anche la questione di legittimità co-

L'Arena 24.1.08

**SENTENZE.** Legale la diagnosi preimpianto

# Procreazione assistita, il Tar sconfessa la legge

Il Tar del Lazio ha accolto il ricorso di un gruppo di associa- chiesto alla Consulta di pronunciarsi sulla costituzionali-

## S22. Overview of preimplantation diagnosis

*L. Gianaroli;*
*S.I.S.Me.R. Reproductive Medicine Unit, Bologna, Italy.*

Following its first clinical application in the year 1990, PGD (Preimplantation genetic diagnosis) was integrated into in vitro fertilization programs for the analysis of genetic disorders before the corresponding embryo is transferred to the patient. This approach represents an important alternative for couples at high reproductive risk which otherwise, in case of an affected fetus, have to decided whether to interrupt a pregnancy after conventional prenatal diagnosis. Throughout the years, the indications were expanded and now PGD is proposed in the following situations: 1) to carriers of monogenic diseases; 2) to carriers of balanced translocations; 3) to couples at risk of generating high proportions of aneuploid embryos for which they are exposed to failed or abnormal implantation; 4) to couples having an affected child requiring bone marrow transplantation from an HLA-identical sibling; and 5) to carriers of predisposition to late onset disorders.

According to the reports of the International Working Group on PGD and the ESHRE PGD Consortium, the demand for PGD has constantly increased and the number of cycles performed worldwide until now exceeds 6000. The reported pregnancy rate ranges from 25 and 30% per cycle with an incidence of obstetric and neonatal complications similar to that reported after ART. The incidence of malformations at birth is also in the same range as that characterized in ICSI children.

The attitude towards PGD is extremely different in the different countries, due to cultural and religious aspects. This variability is present also in Europe, with some countries like Austria, Germany, Italy and Switzerland prohibiting by law the use of the technique. As a results, a form of reproductive tourism began, and couples questing for PGD are now looking for it in the European countries in whom PGD is currently applied.

Per approfondimenti……..



Review

## Preimplantation genetic diagnosis

Karen Sermon, André Van Steirteghem, Inge Liebaers

**Preimplantation genetic diagnosis (PGD) was introduced at the beginning of the 1990s as an alternative to prenatal diagnosis, to prevent termination of pregnancy in couples with a high risk for offspring affected by a sex-linked genetic disease. At that time, embryos obtained in vitro were tested to ascertain their sex, and only female embryos were transferred. Since then, techniques for genetic analysis at the single-cell level, involving assessment of first and second polar bodies from oocytes or blastomeres from cleavage-stage embryos, have evolved. Fluorescence in-situ hybridisation (FISH) has been introduced for the analysis of chromosomes and PCR for the analysis of genes in cases of monogenic diseases. In-vitro culture of embryos has also improved through the use of sequential media. Here, we provide an overview of indications for, and techniques used in, PGD, and discuss results obtained with the technique and outcomes of pregnancies. A brief review of new technologies is also included.**

Preimplantation genetic diagnosis (PGD) is an early form of prenatal diagnosis, in which embryos created in vitro are analysed for well-defined genetic defects; only those free of the defects are replaced into the womb.[1] The technique is used mainly in two broad indication groups. The first group are individuals at high risk of having a child with a genetic disease—eg, carriers of a monogenic disease or of chromosomal structural aberrations, such as translocations—who have repeatedly opted to terminate their pregnancies on the basis of results of prenatal tests, have concurrent infertility (as in congenital bilateral absence of the vas deferens), have had recurrent miscarriages (as is often the case in translocation carriers), or have religious or moral objections to abortion. The second group are those being treated with in-vitro fertilisation (IVF), who might have a low genetic risk but whose embryos are screened for chromosome aneuploidies to enhance their chance of an ongoing pregnancy. PGD for aneuploidy screening (PGD-AS) is mainly applied when a low IVF success rate might be attributable to chromosomal aneuploidies in the embryos, as is sometimes the case in women older than age 37–40 years.[2]

PGD was first described in a clinical setting in a ground-breaking report published in 1990,[3] which had a great effect on UK legislation with respect to embryo research. Preliminary experiments had, however, been described several years earlier.[4,5] The first application for PGD was in patients who were carriers of an X-linked disease and had thus one chance in four of having an affected child.[3] Sequences on the Y-chromosomes were amplified by PCR to discriminate male from female embryos, and only female embryos were transferred. Since then, PCR has been used and refined for diagnosis of several of the more common monogenic diseases.[6] In the early 1990s, a method that allowed single-cell analysis at the chromosomal level was described; fluorescence in-situ hybridisation (FISH) has since replaced PCR as a reliable method for the sexing of embryos,[7,8] and has been widely used for PGD-AS and for detection of imbalanced forms of chromosomal aberrations.[2,9,10]

Here, we discuss methods used for diagnosis of genetic diseases, indications for PGD and PGD-AS, results obtained with the techniques, and subsequent outcomes of pregnancies. We then look ahead at some of the new methods being introduced.

### In-vitro diagnostic procedures

Procedures used to obtain oocytes through ovarian hyperstimulation, IVF techniques such as intracytoplasmic sperm injection, and embryo culture conditions have been widely reviewed elsewhere[11,12] and are considered outside the scope of this review.

### Biopsy of polar bodies and embryos

*Polar-body biopsy*

Polar bodies can be biopsied without affecting an egg's rate of fertilisation or eventual cleavage of the embryo, and can be used to deduce the genotype of the oocyte. To obtain polar bodies, a slit is made in the zona pellucida by mechanical means (with sharp needles) or with laser technology. The polar body is then gently drawn out of the egg with a biopsy pipette.

Verlinsky and colleagues[13] pioneered the approach, to begin with on the first polar body only and later on the second (extruded after fertilisation and completion of the second meiotic division) to increase accuracy of diagnosis.[14] In a large series of first and second polar-body analyses for single-gene disorders, Verlinsky and co-workers[15] correctly identified a genetic disorder in 98% (157 of 160) of oocytes tested.

**Search strategy and selection criteria**

*Lancet* 2004; **363**: 1633–41

# PREIMPLANTATION GENETIC DIAGNOSIS

*Peter Braude, Susan Pickering, Frances Flinter and Caroline Mackie Ogilvie*

Preimplantation genetic diagnosis (PGD) is an evolving technique that provides a practical alternative to prenatal diagnosis and termination of pregnancy for couples who are at substantial risk of transmitting a serious genetic disorder to their offspring. Samples for genetic testing are obtained from oocytes or cleaving embryos after *in vitro* fertilization. Only embryos that are shown to be free of the genetic disorders are made available for replacement in the uterus, in the hope of establishing a pregnancy. PGD has provided unique insights into aspects of reproductive genetics and early human development, but has also raised important new ethical issues about assisted human reproduction.

REPRODUCTIVE RISK
The risk of establishing a pregnancy in which a fetus miscarries or has a phenotypic abnormality as a consequence of the familial genetic condition.

ANEUPLOIDY
The presence of extra copies, or fewer copies, of some chromosomes.

BLASTOCYST
A preimplantation embryo that contains a fluid-filled cavity called a blastocoel.

Preimplantation genetic diagnosis (PGD) is a clinical diagnostic procedure that has evolved from the substantial advances in assisted reproductive technology that have occurred since the first birth resulting from *in vitro* fertilisation (IVF) nearly 25 years ago. PGD was originally developed as an alternative to prenatal diagnosis to reduce the transmission of severe genetic disease for fertile couples with a REPRODUCTIVE RISK[1]. In PGD, cellular material from oocytes or early human embryos that have been cultured *in vitro* (FIG. 1) is tested for a specific genetic abnormality. After diagnosis, only the unaffected embryos are selected for transfer to the uterus. In contrast to this specific and limited application, the same technology has recently been used more frequently to improve IVF success for infertile couples by screening embryos for common or age-related ANEUPLOIDIES (aneuploidy screening, PGD-AS).

The first successful clinical application of PGD for genetic disease involved the use of PCR to amplify a specific repeat on the Y chromosome to sex embryos in the presence of X-linked genetic conditions[2] — in this case, adrenoleukodystrophy (ALD) and X-linked mental retardation. Substantial groundwork for the clinical application of PGD to various conditions (see below for further discussion) was undertaken in the late 1980s and, in 1992, the first live birth was reported following PGD for cystic fibrosis (CF)[2].

Preimplantation testing of embryos is not new[3]. In 1968, Gardner and Edwards were able to sex rabbit embryos using a sex-specific chromatin pattern in BLASTOCYST biopsies, before their transfer to the uterus[4]. Preimplantation testing of embryos is also used routinely in animal husbandry to produce animals of the preferred sex[5]. However, the clinical application of this type of technology, in an attempt to prevent transmission of genetic disease in humans, is still evolving. Measuring cytoplasmic enzyme activity in individual embryonic cells was first investigated, as a method of PGD, for clinical conditions characterized by an absence or a reduction of specific enzyme activity. Among such conditions are severe combined immunodeficiency disorder[6,7] (SCID; adenosine deaminase deficiency), Lesch–Nyhan syndrome (LNS; hypoxanthinephosphoribosyl transferase deficiency) and Tay–Sachs disease[8] (TSD; hexosaminidase deficiency). However, this method turned out to be of limited use when it became clear that it was difficult to distinguish maternally inherited enzyme activity that was present in the oocyte, from the embryo's own enzyme activity. In the mid 1980s, the advent of PCR provided a far superior method for genetic testing, making it possible to carry out a diagnostic test on highly concentrated and relatively pure amplified PCR fragments that spanned the appropriate genetic mutation[9]. The ability to extract DNA and genetically characterize single sperm and diploid cells

*Centre for Preimplantation Genetic Diagnosis, Thomas Guy House, Guy's Hospital, London SE1 9RT, UK.
Correspondence to P.B.
e-mail: obgyn@kcl.ac.uk*
doi:10.1038/nrg953